

# **Suuperäisen bakteri DNA:n esiintyminen perikardiumnesteessä**

LK Joonas Aho  
Syventävien opintojen kirjallinen työ  
Tampereen yliopisto  
Lääketieteen yksikkö  
AtheroRemo / professori Pekka Karhunen  
12/2012

---

Tampereen yliopisto  
Lääketieteen yksikkö  
AtheroRemo / professori Pekka Karhunen

AHO JOONAS: SUUPERÄISEN BAKTEERI DNA:N ESIINTYMINEN  
PERIKARDIUMNESTEESSÄ

Kirjallinen työ, 23 s.

Ohjaajat: FT Tanja Pessi, LL Anne-Mari Louhelainen, professori Pekka Karhunen

Joulukuu 2012

---

Avainsanat: RT-qPCR, sepelvaltimotauti, suuperäiset bakteerit, perikardium, post mortem, oikeuslääketieteellinen ruumiinavaus, PAD-parametrit, TaqMan

Hammashygienian on jo pitkään tiedetty olevan yhteydessä sydän- ja verisuonitauteihin ja suuperäistä bakteeri DNA:ta on löydetty muun muassa sepelvaltimoista. Suuperäisten bakteereiden esiintymisestä perikardiumnesteessä ei sen sijaan ole olemassa tutkimustietoa. Tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää suun bakteereiden ja perikardiumnesteen välistä yhteyttä. Aineistona oli 32 perikardiaspiraattia, jotka oli kerätty Tampereella vuosina 2009–2010 oikeuslääketieteellisen ruumiinavauksen yhteydessä. Vainajien post-mortem aika oli 7 vuorokautta tai vähemmän. Näytteistä eristettiin DNA, joka monistettiin käyttämällä spesifisiä alukkeita reaaliaikaisessa kvantitatiivisessa polymeerasiketjureaktiossa (RT-qPCR). Näytteistä analysoitiin endodonttisia (*Str. mitis* ja *Str. anginosus*- ryhmät, *Staphylococcus aureus*, *Staph. epidermidis*, *Parvimonas micra*, *Prevotella intermedia*), ja periodonttisia bakteereita (*Fusobacterium nucleatum*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Dialister pneumosintes*, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*) ja lisäksi mitattiin *Chlamydia pneumoniae*. Määritimme näytteistä myös kokonaisbakteeri DNA:n pitoisuuden ja humaani DNA:n määrän. Yleisin löydetty bakteeri oli streptokokki (*Str. mitis* – ryhmän bakteerit). Bakteerituloksia verrattiin histologisista laseista kerättyihin patologis-anatomisiin (PAD) löydöksiin: sepelvaltimotaudin aste, oliko kuolema sydänperäinen, sydänlihaksen arpeutuminen, sekä sepelvaltimoiden epästabiili plakki ja kalkki. Tulokset osoittivat, että perikardiumnesteen kokonaisbakteeri määrän ja sepelvaltimotaudin vaikeusasteen välillä oli tilastollisesti merkitsevä yhteys ( $p=0,035$ ): vaikeaa sepelvaltimotautia sairastavilla vainajilla oli enemmän bakteeri DNA:ta perikardiumnesteessä kuin tautia sairastamattomilla. Kymmenen vainajan bakteerituloksia ei käytetty assosiaatiolaskuissa, koska ne eivät täyttäneet vainajanäytteille aikaisemmin määriteltyjä mikrobiologisia kriteereitä. Saatu tulos oli pienestä otoksesta ( $n=22$ ), joten vaikka tulos on positiivinen ja lupaava, lisätutkimusta suuremmalla otoskoolla olisi suositeltavaa suorittaa tulosten varmentamiseksi. Nämä alustavat tutkimustulokset viittaavat siihen, että suun bakteereita voidaan osoittaa perikardiumnesteestä ja niiden määrä on verrannollinen sepelvaltimotaudin asteeseen. Tutkimuksessa ei havaittu yhteyttä muiden PAD löydösten ja perikardiumnesteen suuperäisten bakteerien välillä. Tulosten perusteella voisi olla aiheellista pyrkiä lisäämään perikardiumnesteen roolia sydän- ja verisuonitautien diagnostiikassa sekä keskittämään enemmän huomiota suun hygieniaan mietittäessä sepelvaltimotaudin ennaltaehkäisystrategiaa.

# SISÄLLYS

1 JOHDANTO .....	1
1.1 Perikardium ja perikardiumneste .....	1
1.2 Perikardiaalinen effuusio; aiheuttajat ja seuraukset.....	2
1.3 Sydän – ja verisuonitautien yleisyys, kuolleisuus sekä tärkeimpiä riskitekijöitä .....	3
1.4 Suuperäiset bakteerit.....	4
1.5 Polymeraasiketjureaktio infektiodiagnostiikan apuvälineenä.....	5
1.6 Tutkimuksen tavoitteet ja tarkoitus.....	5
2 AINEISTO JA MENETELMÄT .....	6
2.1 Aineisto ja kliiniset parametrit.....	6
2.2 Humaani- ja bakteeri DNA:n määrittäminen .....	6
2.3 Tilastolliset menetelmät .....	9
3 TULOKSET .....	10
3.1 Aineiston kuvaus.....	10
3.2 Suuperäisten bakteereiden yleisyys perikardiumnäytteissä .....	13
3.3 Bakteeri DNA:n relatiivinen määrä ja sen merkitys .....	13
4 POHDINTA .....	18
LÄHTEET .....	21
LIITTEET .....	23

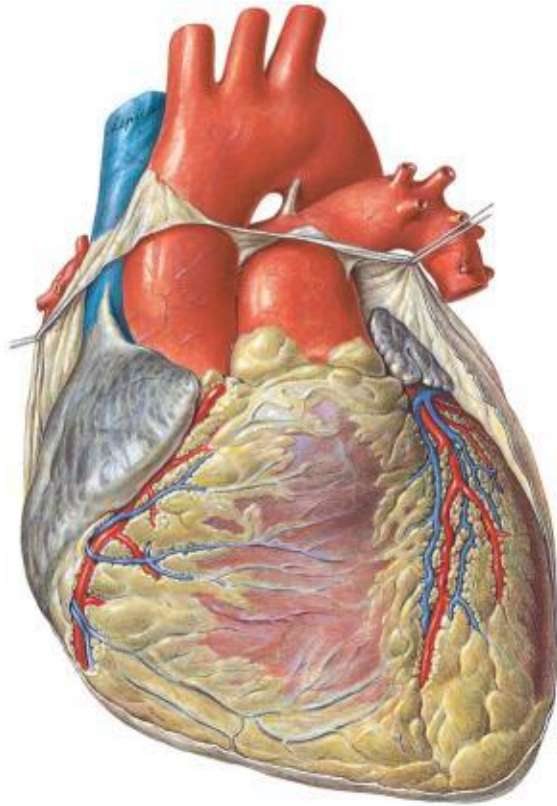
# 1 JOHDANTO

## 1.1 Perikardium ja perikardiumneste

Sydäntä ympäröi kaksikerroksinen sydänpussi eli perikardium. Perikardiumin ulompi osa on tiukasti kiinni palleassa, pleuran välikarsinaan yhteydessä olevassa osassa sekä sternumissa. Tätä fibroosia perikardiumia verhoaa sileä, seroosi membraani, joka myös peittää sydämen. Seroosi kalvo koostuu kahdesta osasta, joista parietaalinen seroosi kerros verhoaa fibroosia perikardiumia ja viskeraalinen seroosi kerros peittää sydäntä. Seroosin perikardiumin kerrosten väliin jää normaalisti pieni perikardiaalinen ontelo eli sydänpussinontelo, jonne molemmat seroosit membraanit erittävät perikardiumnestettä. (1)

Perikardiumnesteen normaalista fysiologisesta koostumuksesta on olemassa hyvin niukasti tutkimustietoa. Ben-Horin et al. tutkivat perikardiumnesteen koostumusta potilailta, jotka kävivät avosydänleikkauksessa (n=30). Tulosten perusteella perikardiumnesteessä oli odotettua runsaammin laktaattidehydrogenaasia (2,4 x seerumin pitoisuus, 398 UI/L) ja proteiinia (3,3 g/dL). Pienten molekyylien, kuten urean, glukoosin, virtsahapon ja kreatiniinin sekä elektrolyyttien, pitoisuudet vastasivat plasman pitoisuuksia. Leukosyyttejä nesteessä oli keskimäärin 1430 kpl/uL, joista eniten oli lymfosyyttejä (53 %) ja monosyyttejä (12 %). Perikardiumnesteen määrä tutkittavilla oli 5 -30 millilitraa. (2) Dudzinski et al. (3) tekemän tutkimuksen mukaan neste on koostumukseltaan seroosia transudaattia, jonka mesoteelisolut erittävät. Sitä on normaalisti noin 30 ml ja se on funktionaalisesti plasman ultrafiltraattia, jossa natriumin pitoisuus on noin 138 mM, kaliumin noin 4,5 mM ja kloridin noin 109 mM. Nesteen pH oli tutkituilla 7,57 ja proteiinipitoisuus 3,1 g/dl. Nesteen tehtävänä on voidella perikardiumin kalvoja sydämen sykkiessä ja näin tehdessään vähentää kitkaa viskeraalisen ja parietaalisen kalvon välillä. Perikardiumnesteellä voi myös olla rooli parakriinisten säätelijöiden, kuten natriumpeptidien, prostanooidien ja endoteliinin, sekä komplementin osien varastoinnissa.

Perikardiumin fibroottisen luonteen ansiosta se todennäköisesti toimii rajana, joka suojaa sydäntä infektioiden leviämiseltä ja kasvaimilta.



**Kuva 1.** Sydän ja perikardium. Viskeraalinen seroosi kerros näkyy sydämen pinnalla, parietaalinen seroosi kerros ja fibroosi perikardium puolestaan näkyvät kuvassa irti sydäimestä. (4) Copyright © 2009, Elsevier. All rights reserved.

## 1.2 Perikardiaalinen effuusio; aiheuttajat ja seuraukset

Perikardiumnesteen määrän kasvun eli perikardiaalisen effuusion eräs merkittävä aiheuttaja ovat infektiot ja akuutti perikardiitti. Nestettä voi sydänpuussinonteloon kertyä akuutisti 80–200 ml ja nesteen kertyessä hitaasti jopa kaksi litraa. Pieni tai hitaasti kehittyvä effuusio ei välttämättä ole vaarallinen, mutta suuri ja/tai nopea effuusio johtaa osalla potilaista sydämen tamponaatioon, jossa sydänpuussiin vuotanut veri tai muu neste nostaa painetta sydämen ympärillä. Tämä aiheuttaa

sydämen puristumisen ja toimintakyvyn laskun. (5) Effuusion ja tamponaation aiheuttama hengenvaarallinen tilanne syntyy, koska perikardiumontelolla on hyvin vähän tilaa laajeta ennen kuin sen paine nousee voimakkaasti. Onteloon kertyvä ylenmääräinen neste voi olla koostumukseltaan transudaattia tai eksudaattia, kirkasta, lipidirikasta, veristä tai purulenttia. Useimmissa tapauksissa nesteen kertymisen syy selviää kliinisestä kuvasta ja se voi aiheutua esimerkiksi vakavasta sydämen vajaatoiminnasta, thoraxin alueen metastasoituneesta kasvaimesta, traumasta, aortan dissekaatiosta tai idiopaattisesta perikardiitista. (3) Toisessa Ben-Horin et al. (6) tutkimuksessa, jossa aineiston koko oli 120, yleisimmät effuusion aiheuttajat olivat kasvain, idiopaattiset tekijät sekä akuutti perikardiitti (42, 22 ja 17 kappaletta 120:sta).

### **1.3 Sydän – ja verisuonitautien yleisyys, kuolleisuus sekä tärkeimpiä riskitekijöitä**

WHO:n tekemän selvityksen mukaan krooniset sairaudet aiheuttavat 63 prosenttia kaikista kuolemista vuosittain, ja näistä sydän- ja verisuonitaudit ovat yleisimmät kuolinsyyt. On arvioitu, että sydän- ja verisuonitauteihin kuoli vuonna 2008 17,3 miljoonaa ihmistä. Näistä 7,3 miljoonaa kuoli sepelvaltimotautiin ja 6,2 miljoonaa aivohalvaukseen. Yleisimpiin sydän- ja verisuonitauteihin kuuluvat sepelvaltimotauti, aivoverisuonien taudit, hypertensio, sydämen vajaatoiminta, perifeeriset verisuonitaudit sekä synnynnäiset ja reumaattiset sydänsairaudet. (7) Sydäninfarktin merkittävimpiä riskitekijöitä maailmanlaajuisesti molemmilla sukupuolilla kaikissa ikäluokissa ovat epänormaalit rasva-arvot, tupakointi, keskivartalolihavuus, verenpainetauti, diabetes ja alkoholin kulutus. Säännöllinen päivittäinen liikunta, vihannesten ja hedelmien kulutus sekä psykososiaaliset tekijät ovat niin ikään merkityksellisiä tekijöitä sydäninfarktin kannalta. (8) Sydän- ja verisuonitautien, erityisesti sepelvaltimotaudin, tärkeimpiä yksittäisiä tekijöitä on ikä. Taudin esiasteiden kehittyminen alkaa usein kuitenkin jo aikaisin elämässä, joten ennaltaehkäisy lapsuudesta lähtien on tarpeellista. Riskitekijöihin puuttuminen missä elämän vaiheessa tahansa on hyödyllistä taudin asteesta riippumatta. (9)

## 1.4 Suuperäiset bakteerit

Hammasinfektioiden ja suun hygienian on todettu olevan yhteydessä sydän- ja verisuonitauteihin (10, 11). Verenkiertoon ja sieltä sepelvaltimoihin suun bakteerit saattavat päästä ohimenevän bakteremian kautta esimerkiksi hampaiden harjauksen yhteydessä. (12) Muita tapoja ovat monet hammastoimenpiteet kuten hampaanpoisto, juurihoito ja hampaanvierikudosleikkaus. Lisäksi hampaan kiinnityskudosinfektiot saattavat edesauttaa bakteerien joutumista verenkiertoon. Hammastoimenpiteiden jälkeen suuperäisten bakteerien pääsy verenkiertoon on tavallista, ja alle minuutin kuluttua toimenpiteestä bakteerit ovat saattaneet päästä esimerkiksi sydämeen ja keuhkoihin. Myös huonon suuhygienian seurauksena suun bakteerit saattavat päästä verenkiertoon ja aiheuttaa vakavuudeltaan vaihtelevia sekä akuutteja että kroonisia infektiota (10). Tärkeä juveniilia periodontiittia aiheuttava bakteeri on suuperäinen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, kun taas aikuisille periodontiittia aiheuttavista bakteereista *Porphyromonas gingivalis* on keskeinen patogeeni. (13) *Streptococcus mutans* ja *Str. sobrinus* puolestaan ovat tärkeitä hammaskariesta aiheuttavia bakteereita, ja niiden tiedetään myös aiheuttavan subakuuttia endokardiittia. (14) Kolmas tärkeä suun streptokokki on *Str. mitis*, jonka tiedetään aiheuttavan muun muassa endokardiittia. (15)

Useissa tutkimuksissa (10, 11, 12, 16, 17) on osoitettu, että suuperäistä bakteeri DNA:ta löytyy sepelvaltimonäytteistä. Bakteereiden rooli on kuitenkin epäselvä. Useimmat löydetyistä bakteereista ovat ns. opportunistibakteereita eli aiheuttavat infektiota vain yksilöillä, joilla immuunipuolustus on heikentynyt esimerkiksi syövän, diabeteksen, nivelreuman, AIDSin, hypoksian, iän, immunosuppressiivisen lääkityksen tai elintapojen vuoksi. Lisäksi niiden syy-seuraus suhde on osoittamatta eli sepelvaltimoissa nämä bakteerit saattavat vain olla ateroomaan kiinnittyneitä sivustakatsojia ilman patofysiologista seurausta tai sitten niillä saattaa olla osuutta inflammaation ja plakin instabiliteetin aiheuttajina. Sen sijaan suun infektioiden ja hammastoimenpiteiden sekä endokardiitin välinen kausaliteetti on pystytty osoittamaan. Äskettäin Ohki et al. (18) tutkivat periodontaalibakteereiden esiintymistä sepelvaltimoissa potilailta, joilla oli ollut akuutti sydänkohtaus ja heille oli tehty pallolaajennus. Koronaarivaltimoista poistettiin trombi ja se otettiin bakteereiden tutkimista varten. Polymeerasiketjureaktion (PCR) avulla näytteistä löydettiin kolmea erilaista suusta peräisin olevaa bakteeria (19,7 %:ssa *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, 3,4 %:ssa *Porphyromonas gingivalis* ja 2,3 %:ssa *Treponema denticola*). Kozarov et al. (19) saivat

samankaltaisia tuloksia kuusi vuotta aiemmin (vuonna 2006) tekemässään tutkimuksessa. He havaitsivat reaaliaikaisen kvantitatiivisen PCR:n avulla näytteistä muun muassa *A. actinomycetemcomitansia*, *Streptococcus mutansia*, *Bacteroides* – suvun lajeja sekä *Chlamydia pneumoniaeta*. Heidän tulostensa perusteella suuperäistä bakteeri DNA:ta löytyy yleisesti nuorten ihmisten ateroomista, mutta erityisen usein vanhemmilta ihmisiltä (esimerkiksi *Bacteroides* – sukua tavattiin ~ 80 %:lla vanhemmista potilaista).

## 1.5 Polymeraasiketjureaktio infektiodiagnostiikan apuvälineenä

Reaaliaikainen kvantitatiivinen polymeraasiketjureaktio (RT-qPCR) on paljon herkempi kuin perinteinen viljely- ja värjäystutkimus. Sen avulla on mahdollista löytää näytteistä bakteereita, joita on vaikea viljellä tai jotka eivät kasva perinteisissä bakteeriviljelmissä. Viljelymenetelmät ovat melko työläitä ja hitaita; pesäkkeiden kasvu paljaalla silmällä havaittaviksi vie nopeimmillaankin viljelymaljalla 12–24 tuntia. Lisäksi viljelyllä voidaan havaita vain eläviä bakteereita, kun PCR:n avulla voidaan havaita kaikki bakteeriperäinen DNA, kuten kuolleet bakteerit tai makrofagien fagosytoiman bakteerin DNA:n fragmentit (20). RT-qPCR:n etuja ovat sen nopeus, herkkyys, tarkkuus ja automatisoitavuus. Menetelmän nopeus, helppokäyttöisyys ja kustannustehokkuus ovat avainasemassa käytettäessä sitä infektiodiagnostiikan apuvälineenä. Bierly (2012) arvelee artikkelissaan, että PCR:n rooli niin tutkimuksessa kuin lääketieteessäkin tulee tulevaisuudessa kasvamaan ja PCR -pohjaisten ratkaisujen käyttö esimerkiksi geenien ekspression tutkimisessa ja muussa lääketieteessä lisääntymään (21).

## 1.6 Tutkimuksen tavoitteet ja tarkoitus

Tutkimuksen tavoitteena oli selvittää sydänpussin ja perikardiumnesteiden merkitystä sydän- ja verisuonitaudeissa sekä suunmikrobien osuutta sydämen kliinisiin patologist-anatomisiin (PAD) löydöksiin. Tarkoituksena oli selvittää, löytyykö perikardiumnesteestä suuperäistä bakteeri DNA:ta ja vaikuttaako sen määrä mitattuihin PAD löydöksiin. Perikardiumnesteestä ja sen koostumuksesta on tällä hetkellä olemassa niukasti tutkimustietoa, joten saaduista tuloksista saattaa olla hyötyä esim. myöhemmin suoritettavissa oikeuslääketieteellisissä ruumiinavauksissa sekä tautien diagnostiikassa.



## **2 AINEISTO JA MENETELMÄT**

### **2.1 Aineisto ja kliiniset parametrit**

Tutkimuksen aineistona käytettiin Tampereella vuosina 2009 - 2010 kerättyjä 32 perikardiumaspiraattia (1 ml), jotka oli kerätty vainajilta rutiiniruumiinavauksen yhteydessä aseptisesti ennen varsinaista ruumiinavausta. Tutkimusaineisto täytti seuraavat kriteerit: kuolema on tapahtunut sairaalan ulkopuolella, miessukupuoli, vainajan ikä yli 18 vuotta, kuolemasta kulunut alle 7 vuorokautta, aika kuoleman ja ruumiin ruumishuoneelle säilömisen välillä alle 24 tuntia, keskitorso ja suoliston limakalvo silmämääräisesti ehjät, ei antibioottien käyttöä kahta viikkoa ennen kuolemaa, ei merkkejä bakteeri-infektiosta tai lääkeriippuvuudesta eikä näkyviä haavoja tai nekroosia. Vainajat säilytettiin ruumishuoneen kylmäkaapissa lämpötilassa +4 °C ja keskimääräinen aika kuoleman ja ruumiinavauksen välillä oli 4,6 vuorokautta (aikaväli 1-7 vuorokautta). Aineisto jaettiin kolmeen ryhmään post mortem ajan perusteella: 1-3 päivää, 4-5 päivää ja 6-7 päivää kuolleen olleet.

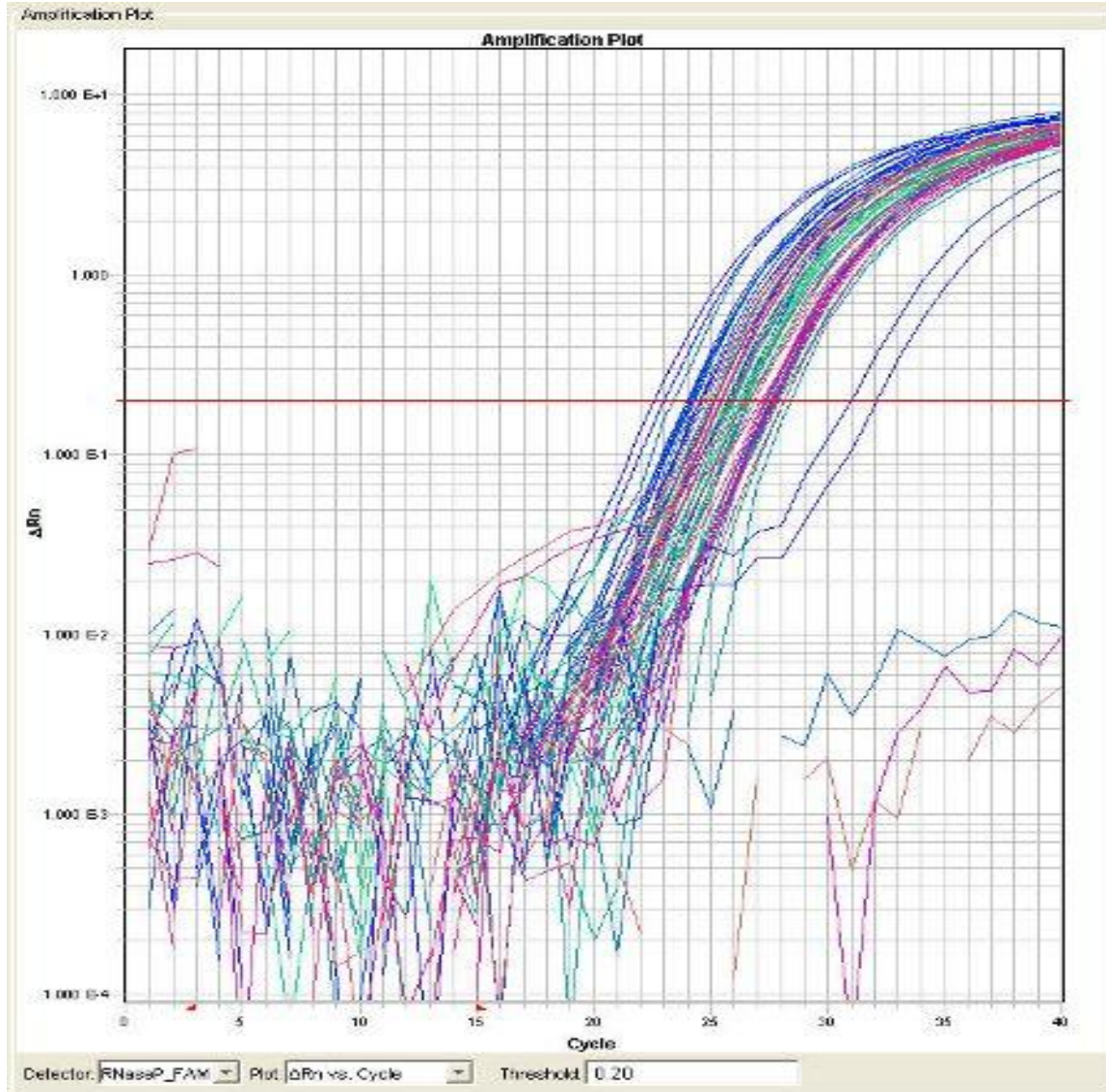
Kliiniset parametrit kerättiin ruumiinavauspöytäkirjoista ja mikroskooppilauseunnoista. Aineistosta määritettiin ikä kuollessa, paino, BMI eli painoindeksi, post mortem eli aika kuolemasta ruumiinavaukseen, sydämen paino, patologis-anatomiset (PAD) parametrit eli sepelvaltimotaudin aste (MCC; morbus cordis coronarius), oliko kuolema sydänperäinen (CVD; cardiovascular death), sydänlihaksen arpeutuminen, sepelvaltimoiden epästabiili plakki sekä sepelvaltimoiden kalkki, ja bakteeri DNA:n relatiivinen ja totaalimäärä sekä humaani DNA:n totaalimäärä.

### **2.2 Humaani- ja bakteeri DNA:n määrittäminen**

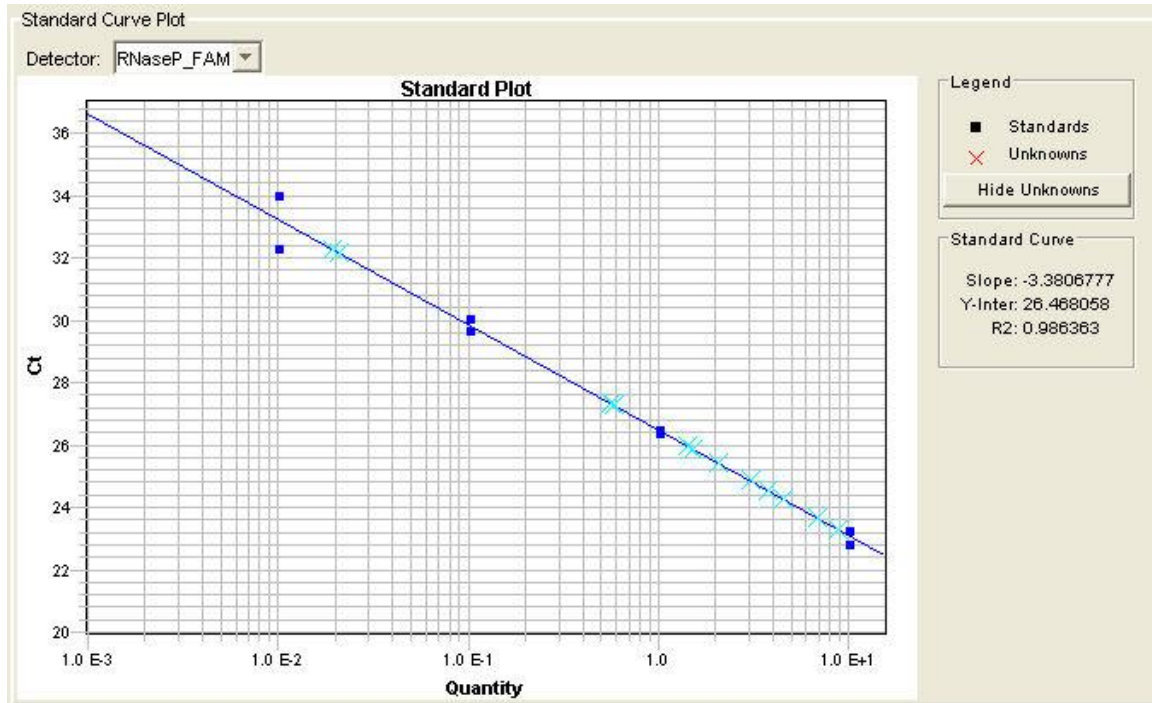
Perikardiumnäytteistä eristettiin DNA Zymon Bacterial/Fungal DNA Kit (Zymo Research Corporation, California, USA) avulla. Tutkimuksessa käytettiin suubakteeri DNA:n kohdalla aikaisemmin mitattuja tuloksia (20). Eristetyn bakteeri DNA:n määrä ja laatu määritettiin

käyttämällä reaaliaikaista kvantitatiivista polymeraasiketjureaktiota (RT-qPCR) spesifisillä primereilla ja probeilla (*Liite 1*). Määritetyt bakteerit olivat streptokokkisuvun bakteereita (*Streptococcus mitis* – ja *Streptococcus anginosus* – ryhmät), *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Treponema denticola*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Dialister pneumosintes*, *Porphyromonas gingivalis*, *Parvimonas micra* ja *Chlamydia pneumoniae*. Kokonaisbakteeri DNA:n määrä mitattiin käyttämällä universaaliprimereita ja -probeja sekä kokonaishumaani DNA:n määrä TaqManin RNase P Detection Reagents -kitin (Applied Biosystems Oy, USA) avulla.

Humaani DNA:n määrittämisessä RT-qPCR suoritettiin AbiPrism 7900 HT Sequence Detection System – laitteella (TaqMan, Applied Biosystems, California, USA) valmistajan ohjeiden mukaan. Reaktioliuoksen kokonaistilavuus oli 5 µl ja siinä oli 1,25 µl tislattua vettä, 2,50 µl TagMan Universal II Master Mixiä, 0,25 µl primer-probe – liuosta, jossa oli 900 µM PCR – aluketta ja 200 µM probea, ja 1,00 µl näytettä. PCR syklien määrä oli 40 ja tulokset analysoitiin SDS 2.2 – ohjelmalla (Applied Biosystems, California, USA). Kriittinen kynnsarvo (critical threshold, Ct) ilmaisi PCR syklien määrän, jolloin fluoresenssilla leimatusta probesta vapautunut fluoresenssi ylitti kynnsarvon 0,2. Ct on kääntäen verrannollinen alkuperäisen näytteen DNA:n määrään eli mitä enemmän näytteessä on DNA:ta, sitä pienempi on Ct – luku (*Kuva 2*). Bakteeri DNA:n positiivisuus ja relatiivinen määrä näytteissä määritettiin käyttämällä niin sanottua komparatiivista Ct – menetelmää (20, 22). Laskuissa käytettiin referenssiyksilönä terveen ihmisen laskimoverinäytettä (20). Kullekin näytteelle laskettiin Ct – arvojen väliset erot ( $\Delta Ct$ ) siten, että näytteen bakteeri Ct – arvosta vähennettiin humaanin Ct. Tämän jälkeen laskettiin  $\Delta\Delta Ct$ , jossa terveen ihmisen verinäytteen  $\Delta Ct$  – arvo toimi referenssinä, joka vähennettiin perikardiumnäytteen  $\Delta Ct$  – arvosta ( $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$  (näyte) -  $\Delta Ct$  (referenssi)). Komparatiivisen Ct – arvon ( $\Delta\Delta Ct$ ) avulla laskettiin bakteeri DNA:n relatiivinen määrä (relatiivinen määrä =  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ). Tulos tulkittiin positiiviseksi, jos bakteeri DNA:n relatiivinen määrä  $2^{-\Delta\Delta Ct} \geq 2$ . Humaani- ja bakteeri DNA:n kokonaismäärä analysoitiin käyttämällä standardisuoraa. Standardisuoraa varten tehtiin laimennussarja sekä humaanin DNA:sta että *E. coli* DNA:sta, jonka avulla määritettiin PCR:n kulmakerroin ja vakio. Kokonaismäärät laskettiin kaavalla  $Ct = -\text{kulmakerroin} * \log(x) + \text{vakio}$  (*Kuva 3*). Saatuja tuloksia verrattiin histologisista laseista määritettyihin patologis-anatomisiin löydöksiin.



**Kuva 2.** RT-qPCR ajo perikardiumnäytteistä käyttäen RNase P – geenin alukkeita ja probeja. Punainen viiva osoittaa kriittisen kynnyksarvon ( $C_t=0,2$ ), jota käytettiin määrittämään näytteen suhteellinen ja absoluuttinen DNA - määrä



**Kuva 3.** Humaani DNA:n kokonaismäärän laskussa apuna käytetty standardisuora. DNA:n kokonaismäärä (x) laskettiin kaavalla  $Ct = -\text{kulmakerroin} \cdot \log(x) + \text{vakio}$ , jossa kulmakerroin  $= -3,38068$ , vakio  $= 26,46806$  ja Ct saatiin edellä mainitulla tavalla. Bakteri DNA:n kokonaismäärä laskettiin samalla kaavalla kuin humaan DNA:n eli  $Ct = -\text{kulmakerroin} \cdot \log(x) + \text{vakio}$ , jossa kulmakerroin oli  $-2,53894$  ja vakio  $20,88759$ .

## 2.3 Tilastolliset menetelmät

Muuttujien frekvenssit laskettiin ja tilastollinen analyysi suoritettiin SPSS 18.0 – ohjelmalla (SPSS Inc., Chicago, USA). Aineiston suuren hajonnan vuoksi analyyseja ja kuvaajia varten bakteri- ja humaan DNA:n määrät muutettiin 10-kantaiseksi logaritmiksi ( $\lg 10$ ). Kliinisten parametrien ja perikardiumin bakterilöydösten välistä yhteyttä selvitettiin yksisuuntaisen varianssianalyysin (One-way ANOVA) avulla. Post Hoc testien avulla etsittiin toisista ryhmistä poikkeavia tuloksia sekä LSD- että Bonferronin testiä käyttäen. Testeissä verrattiin kunkin ryhmän keskiarvoa erikseen kaikkiin muihin ja samalla ohjelma laski tilastollisen merkitsevyyden. P-arvon ollessa  $\leq 0,05$  tulos tulkittiin tilastollisesti merkitseväksi.

## 3 TULOKSET

### 3.1 Aineiston kuvaus

Tutkimuksen aineisto koostui 32 potilaasta, joilta kerättiin näyte perikardiumnesteestä oikeuslääketieteellisen ruumiinavauksen yhteydessä. Kliiniset parametrit esitellään *taulukossa 1*.

**Taulukko 1.** Kliinisten parametrien taulukko, josta käy ilmi keskiarvo, mediaani, keskihajonta, minimi ja maksimi

	N		Keskiarvo	Mediaani	Keskihajonta	Minimi	Maksimi
	Validi	Poissa					
Ikä kuollessa (v)	32	0	56,9	56,0	15,1	20	86
Paino (kg)	32	0	85,8	84,0	19,0	58	132
BMI	32	0	28,18	27,59	6,04	18,39	43,59
Kuolleena (pvä)	32	0	4,6	5,0	1,7	1	7
Sydämen paino (g)	31	1	539	491	175,7	256	906

Potilaiden keski-ikä oli 56,9 vuotta (ikähaarukka 20–86), BMI 28,18 (vaihteluväli 18,39–43,59) ja paino 85,8 kg (vaihteluväli 58–132 kg) (*Taulukko 1*). Yhteensä potilaista 27 kuoli määritettyyn tautiin, joista 19 (59,4 % kaikista) oli sydänperäisiä. Kolme kuoli tapaturmaisesti, yksi teki itsemurhan ja yhden kohdalla kuolemanluokka jäi epäselväksi (*Taulukko 2*). Keskimäärin bakteeri DNA:ta näytteissä oli 2,43 pg/ml ja humaan DNA:ta 2,01 ng/ml (*Taulukko 3*). Yhdeksässätoista (59,4 %) näytteessä bakteerien relatiivinen määrä oli välillä 0-2 eli alle positiivisen rajan. Kolmetoista (40,6 %) näytettä tulkittiin positiiviseksi relatiivisen määrän ollessa yli 2. Sydämen PAD – parametrien esiintyminen aineistossa on nähtävillä *taulukossa 4*. Vaikea sepelvaltimotauti oli 12:lla potilaista (37,5 %), lievä tauti kahdeksalla (25,0 %) ja 12:lla (37,5 %) ei sepelvaltimotautia ollut havaittavissa. Yhdeksällä (28,1 %) oli lievä/hajapesäke arpi ja kuudella (18,8 %) selvä/vaikea arpi, 17 potilaalla (53,1 %) ei sydänlihas ollut arpeutunut. Sepelvaltimoista löydettiin kalkkia 17 potilaalla (53,1 %), kun taas epästabiili plakki havaittiin kolmella (9,4 %). Kunkin näytteen bakteeri- ja humaan DNA:n totaalimäärä sekä bakteerien relatiivinen määrä on esitelty *taulukossa 5*.

**Taulukko 2.** Tutkittujen kuolemanluokat. Tautikuolemista 19 (59,4 %) oli sydänperäisiä

	Frekvenssi	%	Prosenttia kaikista	Kumulatiivinen prosentti
Tauti	27	84,4	84,4	84,4
Tapaturma	3	9,4	9,4	93,8
Itsemurha	1	3,1	3,1	96,9
Epäselvä	1	3,1	3,1	100,0
Total	32	100,0	100,0	

**Taulukko 3.** Bakteeri- ja humaan DNA:n kokonaismäärien sekä bakteeri DNA:n relatiivisen määrän keskiarvo, mediaani, keskihajonta, minimi ja maksimi. Yksi näyte jätettiin pois analyysistä, koska sen bakteeripitoisuus poikkesi huomattavasti muista (katso taulukko 5, vainaja nro 4)

	N		Keskiarvo	Mediaani	Keskihajonta	Minimi	Maksimi
	Validi	Poissa					
Bakteeri DNA, relatiivinen määrä	31	0	2,21	1,44	2,97	0,057	16,74
Bakteeri DNA, kokonaismäärä pg/ml	31	0	2,43	1,51	2,64	0,199	12,43
Humaani DNA, kokonaismäärä ng/ml	31	0	2,01	1,42	2,28	0,318	12,23

**Taulukko 4.** Sydämen kliiniset parametrit

VAINAJA NRO	MCC	CVD	ARPI	EPÄSTABIILI PLAKKI	KALKKI
2	2	2	1	1	1
3	0	0	0	0	0
4	0	2	1	0	0
5	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0
10	0	2	1	0	0
11	1	2	0	0	1
12	0	0	0	0	0
13	0	2	0	1	0
14	1	0	1	0	1
15	2	2	2	0	1
16	2	2	2	0	1
17	1	0	0	0	0
18	2	2	2	0	1
19	1	2	1	0	1
20	2	2	0	0	1
21	2	2	1	0	1
22	1	0	0	0	1
23	2	2	2	0	1
24	2	2	2	0	1
25	1	0	0	0	0
26	0	0	0	0	0
27	1	2	0	0	1
28	2	2	1	1	0
29	2	2	0	0	1
30	0	0	0	0	0
40	1	2	2	0	1
41	2	2	1	0	1
42	2	2	1	0	1

MCC, sepelvaltimotaudin aste: 0 = ei sepelvaltimotautia, 1 = lievä sepelvaltimotauti, 2 = vaikea sepelvaltimotauti, CVD, cardiovascular death: 0 = ei sydänperäinen kuolema, 1 = sydän kuolemaan myötävaikuttava tekijä, 2 = sydänperäinen kuolema, ARPI, sydänlihaksen arpeutuminen: 0 = ei arpea, 1 = lievä tai hajapesäke arpi, 2 = selvä tai vaikea arpeutuminen, epästabili plakki (plakkiruptuura, veritulppauma tms): 0 = ei, 1 = kyllä, kalkki (sepelvaltimoissa): 0 = ei, 1 = kyllä

**Taulukko 5.** Bakteeri- ja humaani DNA:n kokonaismäärät, bakteerien suhteellinen osuus tutkituilla sekä näytteiden positiivisuus bakteerien suhteen. Näyte tulkittiin positiiviseksi, jos suhteellinen osuus oli  $\geq 2$ . POS/NEG ilmoittaa näytteiden positiivisuuden bakteerien suhteen (0=negatiivinen, 1=positiivinen)

VAINAJA NRO	RELAT. BAKTEERIT	TOTAALI BAKTEERIT (pg/ml)	TOTAALI HUMAANI (ng/ml)	POS/NEG
2	0,06	0,505	12,23	0
3	0,81	1,302	1,83	0
4	295856,8	62007,3	0,02	1
5	0,42	1,629	4,16	0
6	1,86	1,108	0,72	0
7	0,49	2,034	4,19	0
8	0,16	0,489	4,46	0
9	1,06	5,402	4,10	0
10	0,39	1,199	3,51	0
11	2,26	7,699	2,55	1
12	3,21	5,995	1,50	1
13	3,18	12,434	2,62	1
14	3,10	1,271	0,48	1
15	2,24	3,614	1,46	1
16	16,74	6,603	0,32	1
17	3,64	1,068	0,36	1
18	2,01	0,735	0,49	1
19	1,43	1,235	1,01	0
20	3,05	1,882	0,66	1
21	1,39	1,851	1,40	0
22	0,68	1,439	2,35	0
23	1,34	1,177	1,04	0
24	1,80	1,670	1,01	0
25	0,99	1,505	1,68	0
26	1,96	0,897	0,58	1
27	3,57	1,557	0,49	1
28	5,45	3,029	0,53	1
29	1,34	1,786	1,42	0
30	1,06	2,803	2,51	0
40	1,88	0,567	0,43	0
41	0,58	0,642	1,50	0
42	0,43	0,199	0,83	0

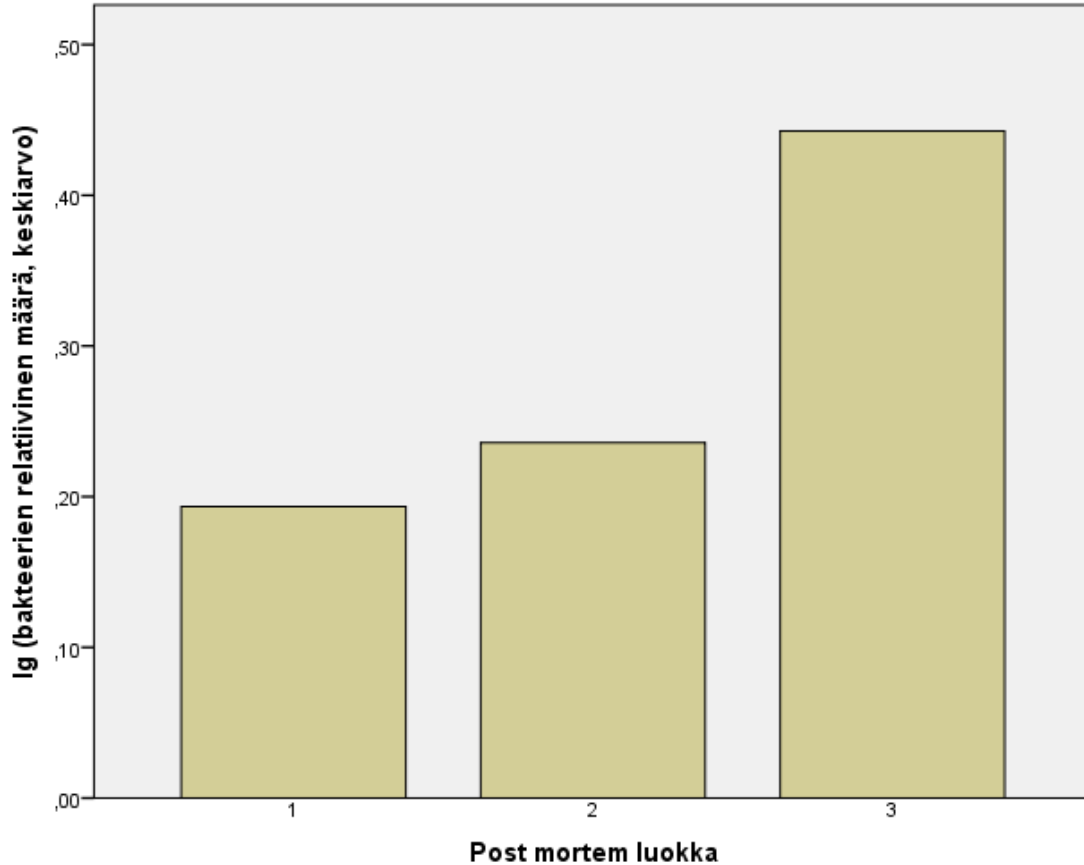
### 3.2 Suuperäisten bakteereiden yleisyys perikardiumnäytteissä

Tutkimuksen suuperäisten bakteereiden osalta käytettiin aikaisemmin mitattuja oraalibakteerimittauksia (20). Mitattujen bakteerien pitoisuudet näytteissä olivat pieniä ja aineisto rajallinen (n=32), joten bakteeritulokset määriteltiin endodonttisiin ja periodonttisiin bakteereihin. Endodonttisia bakteereita olivat streptokokkisuvun bakteerit (*Str. mitis*- ja *Streptococcus anginosus*-ryhmät), *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Parvimonas micra* ja *Prevotella intermedia*. Periodonttisiin bakteereihin luettiin *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Dialister pneumosintes* ja *Treponema denticola*. Näytteiden positiivisuus määritettiin samalla tavalla kuin edellä eli näyte tulkittiin positiiviseksi, jos bakteerien relatiivinen määrä oli  $\geq 2$ . Tällä menetelmällä näytteistä 23 (71,9 %) osoittautui positiiviseksi endodonttisten ja 11 (34,4 %) periodonttisten bakteereiden suhteen.

### 3.3 Bakteri DNA:n relatiivinen määrä ja sen merkitys

Bakteeri DNA:n suhteellinen määrä perikardiumnäytteissä nousi jyrkästi, kun post mortem aika kasvoi (*Kuva 4*), joten ajalla oli selkeä yhteys näytteiden steriiliyteen. Sama havaittiin myös kokonaisbakteeri DNA:n suhteen. Post mortem ajan ryhmissä yksi ja kaksi DNA:n määrä oli lähes sama, mutta ryhmässä kolme havaittiin selkeä bakteeri DNA:n määrän lisääntyminen (*Kuva 5*). Tästä syystä kolmanteen ryhmään (post mortem 6-7 päivää) kuuluvat potilaat jätettiin lopullisesta arvioinnista pois kuoleman jälkeisen kontaminaation vuoksi. Jäljelle jäi 22 potilasta (*Taulukko 6*), joiden osalta suoritettiin tarkempi tilastollinen analyysi. Tämän ryhmän keski-ikä oli 52,9 vuotta ( $\pm 15,1$  vuotta), BMI 27,96 ( $\pm 6,4$ ) ja paino 86,9 kg ( $\pm 20,0$  kg). Keskimääräinen aika kuoleman ja ruumiinavauksen välillä oli 3,7 vuorokautta ( $\pm 1,3$  vuorokautta). *Taulukossa 7* esitellään tämän ryhmän (n=22) bakteeri- ja humaani DNA:n määriä. Bakteri DNA:n kokonaismäärän keskiarvo näissä näytteissä oli 2,99 pg/ml ja humaani DNA:n 1,79 ng/ml.

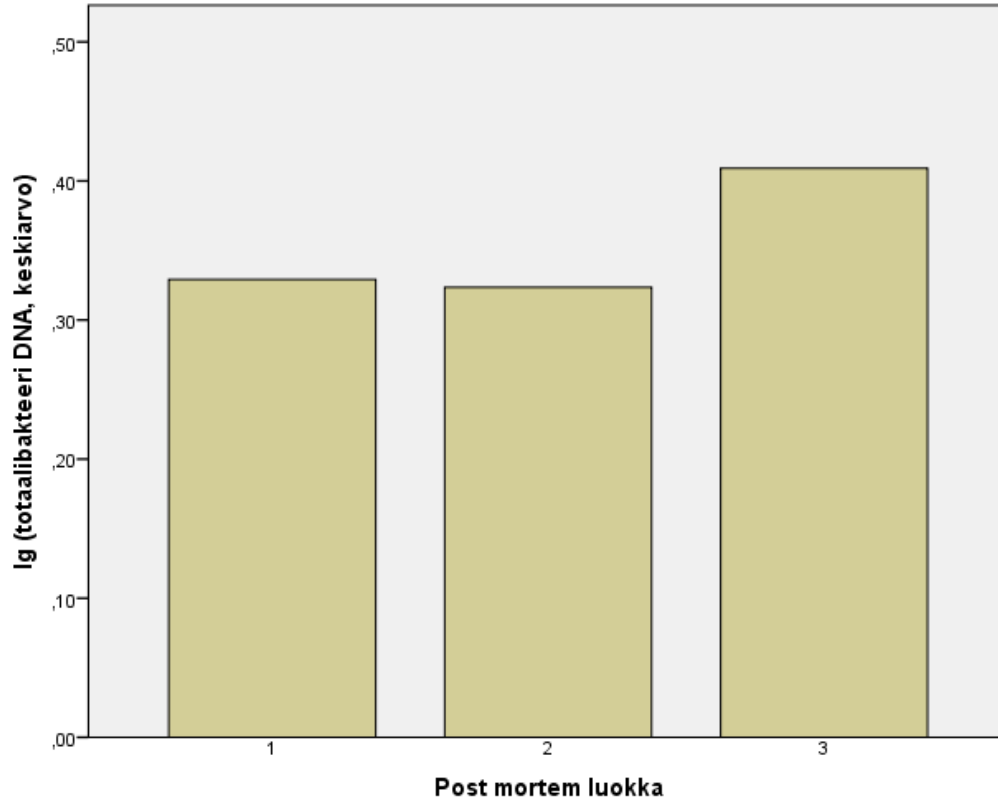




**Kuva 4.** Pylväsdiagrammi, josta nähdään, että bakteeri DNA:n relatiivinen määrä näytteissä kasvoi jyrkästi viimeisessä post mortem ryhmässä (6-7 päivää kuolleena olleet). Bakterimäärät ovat kymmenkantaisena logaritmina.

**Taulukko 6.** Kliinisten parametrien taulukko, jossa on mukana tutkituista  $\leq 5$  päivää kuolleena olleet. Taulukosta käy ilmi parametrien keskiarvo, mediaani, keskihajonta, minimi ja maksimi

	N	Keskiarvo	Mediaani	Keskihajonta	Minimi	Maksimi
	Validi					
Ikä kuollessa (v)	22	52,9	51,5	15,1	20	86
Paino (kg)	22	86,9	84,0	20,0	58	132
BMI	22	27,96	27,01	6,4	18,39	43,59
Kuolleena (pvä)	22	3,7	4,0	1,3	1	5
Sydämen paino (g)	22	499	473	141,3	293	881

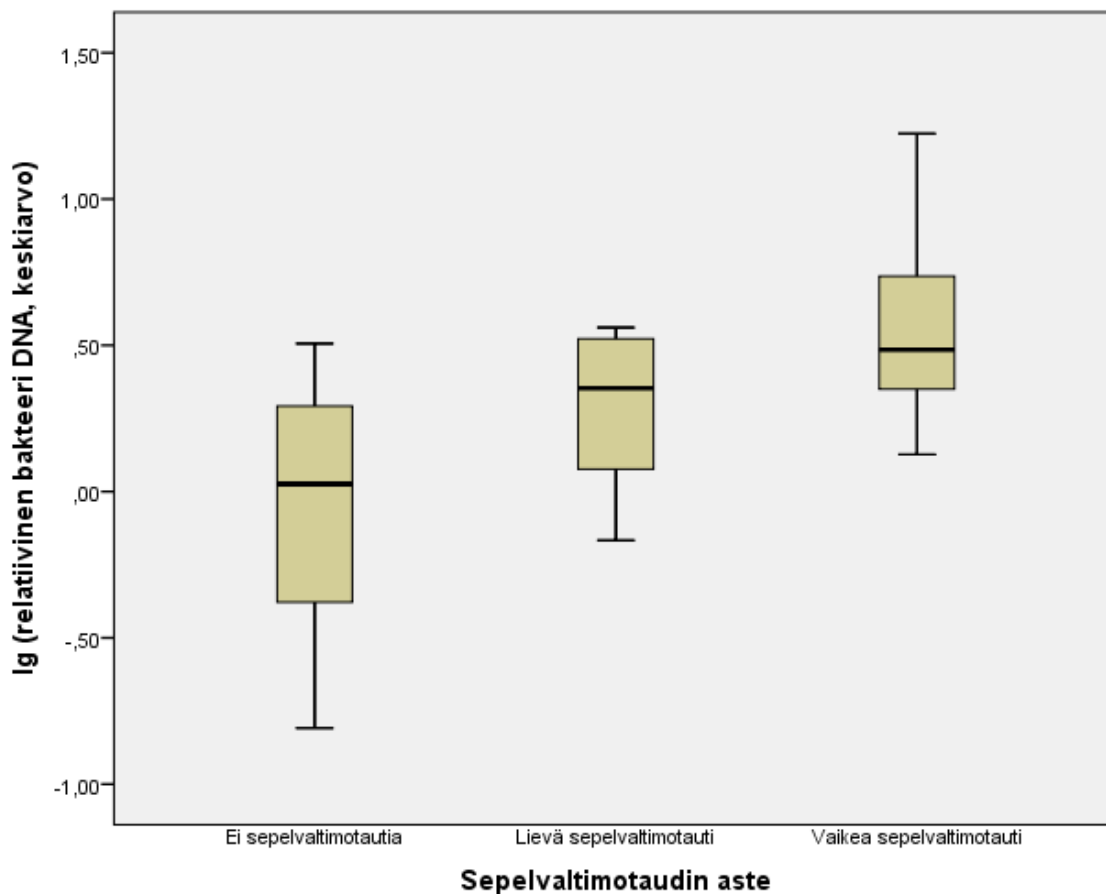


**Kuva 5.** Kokonaisbakteeri DNA:n määrä pysyi vakaana aina viiteen päivään asti kuolemasta, mutta tämän jälkeen se lisääntyi viitaten kuoleman jälkeiseen kasvuun.

**Taulukko 7.** Bakteeri- ja humaan DNA:n kokonaismäärien sekä bakteeri DNA:n relatiivisen määrän keskiarvo, mediaani, keskihajonta, minimi ja maksimi  $\leq 5$  päivää kuolleina olleiden osalta.

	N		Keskiarvo	Mediaani	Keskihajonta	Minimi	Maksimi
	Validi	Poissa					
Bakteeri DNA, relatiivinen määrä,	22	0	2,66	1,91	3,42	0,16	16,74
Bakteeri DNA, kokonaismäärä pg/ml,	22	0	2,99	1,59	2,93	0,49	12,43
Humaani DNA, kokonaismäärä ng/ml,	22	0	1,79	1,48	1,33	0,32	4,46

Perikardiumnesteen kokonaisbakteeri DNA:n pitoisuuden ja sepelvaltimotaudin asteen välillä havaittiin tilastollisesti merkitsevä yhteys, kun 6-7 päivää kuolleena olleet jätettiin pois ( $p=0,035$ , *Kuva 6*). Näytteissä oli sitä enemmän bakteeri DNA:ta suhteessa humaani DNA:han, mitä vaikeampi sepelvaltimotauti potilaalla oli. Sepelvaltimotautia sairastamattomien ( $n=10$ ) perikardiumnäytteissä bakteeri DNA:n relatiivinen määrä oli keskimäärin  $1,41 (\pm 1,11)$ , lievää tautia sairastavilla ( $n=7$ )  $2,24 (\pm 1,23)$  ja vaikean sepelvaltimotaudin potilailla ( $n=5$ )  $5,76 (\pm 6,32)$  (*Taulukko 8*). Muiden patologi-anatomisten löydösten ja perikardiumnesteen bakteerien määrän välillä ei tilastollisesti merkittävää korrelaatiota ollut havaittavissa.



**Kuva 6.** Sepelvaltimotaudin vaikeusasteen ja bakteeri DNA:n relatiivisen määrän välinen suhde. Kuvasta nähdään, että vaikeaa sepelvaltimotautia sairastaneilla potilailla ( $n=5$ ) DNA:n määrä oli tutkimusryhmän ( $n=22$ ) korkein. Suorat luvut on esitetty *taulukossa 8*.

**Taulukko 8.** Bakteeri DNA:n relatiivinen määrä suhteessa sepelvaltimotaudin asteeseen. Taulukosta nähdään, että bakteerien määrä kasvaa suhteessa taudin asteeseen. P-arvo oli 0,035, joten tulos oli tilastollisesti merkitsevä (rajaksi oli asetettu 0,05)

MCC (sepelvaltimotaudin aste)			Bakteeri DNA, relatiivinen määrä	Humaani DNA, kokonaismäärä, ng/ml
Ei sepelvaltimotautia	N	Validi	10	10
		Poissa	0	0
		Keskiarvo	1,41	2,59
		Mediaani	1,06	2,57
		Keskihajonta	1,11	1,43
		Minimi	0,16	0,58
		Maksimi	3,21	4,46
Lievä sepelvaltimotauti	N	Validi	7	7
		Poissa	0	0
		Keskiarvo	2,24	1,28
		Mediaani	2,26	1,01
		Keskihajonta	1,23	0,92
		Minimi	0,68	0,36
		Maksimi	3,64	2,55
Vaikea sepelvaltimotauti	N	Validi	5	5
		Poissa	0	0
		Keskiarvo	5,76	0,88
		Mediaani	3,05	0,66
		Keskihajonta	6,32	0,53
		Minimi	1,34	0,32
		Maksimi	16,74	1,46

## 4 POHDINTA

Tällä tutkimuksella pyrittiin selvittämään, löytyykö perikardiumnesteestä suuperäistä bakteeri DNA:ta ja onko mahdollisilla löydöksillä yhteyttä PAD löydöksiin. Parhaan käsitykseni mukaan aiheesta ei ole aikaisempaa julkaistua tutkimustietoa. Suuperäisten bakteereiden esiintyminen sepelvaltimonäytteissä on pystytty kuitenkin osoittamaan useissa tutkimuksissa niin PCR:n kuin perinteisen viljelyn avulla ja suuperäisten bakteereiden yhteys sydän- ja verisuonitauteihin on ollut tiedossa jo pitkään (23). Gaetti-Jardim Jr. et al. (24) etsivät suuperäisiä bakteereita sepelvaltimoiden ateroomaplakeista RT-PCR:n avulla. Hampaanvierustulehdusta eli periodontiittia sairastavien potilaiden ateroomaplakeista löytyi periodontaalibakteereita yli 90 prosentilla ja näiden bakteereiden DNA edusti 47,3 % kaikesta bakteeri DNA:sta, joka saatiin eristettyä näiden potilaiden ateroomaplakeista. Periodontiitin suhteen terveiltäkin potilailta suuperäisiä bakteereita löytyi sepelvaltimoiden aterioskleroottisesta kudoksesta suurelta osalta. Ohki et al. julkaisi äskettäin (2012) tutkimuksen, jossa saatiin samankaltaisia tuloksia. He löysivät periodontaalibakteereita akuutin sydänkohtauksen saaneiden potilaiden sepelvaltimoista poistetusta trombista PCR:n avulla (18). On kuitenkin epäselvää, mikä suuperäisten bakteereiden rooli on esimerkiksi sepelvaltimotaudin synnyssä. Bakteerit saattavat olla vain ateroomaan kiinnittyneitä "viattomia sivustakatsojia", niillä voi olla osuutta inflammaation ja/tai plakin repeämisen aiheuttajina, ne voivat olla osallisina verisuonitautien kehittymisessä tai verihituleiden aggregaatioissa sepelvaltimoissa. (12, 18, 24, 25) Verenkiertoon ja sitä kautta sepelvaltimoihin suun bakteerit pääsevät muun muassa monien hammastoimenpiteiden, kuten hampaanpoiston, juurihoidon ja hampaanvieruskudosleikkauksen, ohimenevän bakteremian tai hampaan kiinnityskudosinfektioiden (ikenen, parodontaaliligamentin, juurisementin ja alveoliluun infektiot) kautta (10, 12, 26).

Viimeinen ryhmä (6-7 päivää kuolleena olleet, n=10) jätettiin pois lopullisesta tilastollisesta analyysistä, sillä bakteereiden määrän lisääntyminen näkyi selvästi viidennen päivän jälkeen. Jotta tuloksia voitaisiin pitää luotettavina, oikeina positiivisina tuloksina, sai aika kuolemasta ruumiinavaukseen olla maksimissaan 5 päivää olettaen, että vainajat on säilytetty asianmukaisesti. Lopullinen, tarkempi tilastollinen analyysi suoritettiin post mortem ajan kahdesta ensimmäisestä

ryhmästä (1-3 päivää ja 4-5 päivää kuolleena olleet), jolloin aineiston koko supistui 22:een. Näistä perikardiumnäytteistä 13 osoittautui positiiviseksi suuperäisen bakteeri DNA:n suhteen. Näytteissä ylittyi positiivisuuden rajaksi asetettu relatiivisen bakteeri DNA:n arvo 2. Vertailtaessa bakteeri DNA:n tuloksia ja PAD – löydöksiä, havaittiin tilastollisesti merkitsevä yhteys sepelvaltimotaudin vaikeusasteen ja perikardiumnesteen suhteellisen bakteeri DNA:n määrän välillä kahden ensimmäisen ryhmän osalta. Muiden PAD – löydösten kohdalla ei löydetty yhteyttä perikardiumnesteen bakteerimääriin.

Tutkimuksen rajoittavana tekijänä oli aineiston pieni koko. Tilastollisesti merkitsevä ( $p=0,035$ ) tulos saatiin, kun jo entuudestaan pientä 32 potilaan aineistoa rajattiin 22:een. Näin ollen sen tilastollinen voima jää pieneksi. Myös aikaisemman tutkimustiedon puuttumista voidaan pitää rajoittavana tekijänä, sillä tästä johtuen tutkimukselta puuttuu vertailupohja ja tulosten arviointi vaikeutuu yhdessä otoskoon pienuuden kanssa. Koska PCR:n avulla löydetään kaikki mahdollinen bakteereista peräisin oleva DNA (elävät, kuolleet, fragmentit ja makrofagien sisällä olevat), ei voida olla varmoja, ovatko tulokset peräisin elävistä bakteereista vai onko mukana myös kuollutta materiaalia, joka on vain sattunut ajautumaan paikalle. Vainajien kohdalla, joilla kuoleman ja ruumiinavauksen välillä kulunut aika oli viisi päivää tai alle, voidaan perikardiumista mitattuja bakteeri DNA:n määriä pitää oikeina positiivisina löydöksinä eli perikardiumissa saattoi olla kuoleman hetkellä meneillään infektio tai bakteerit olivat siellä ohimenevän bakteremian seurauksena. Positiivinen tulos ei täten olisi seurausta kuoleman jälkeisestä bakteereiden migraatiosta kyseisillä ryhmillä (1-3 päivää ja 4-5 päivää kuolleena olleet). Tuomisto et al. (20) tulivat samanlaisiin johtopäätöksiin omassa tutkimuksessaan. Heidän mukaansa parhaat kuolemanjälkeiset näytteenottopaikat ovat perikardiumneste yhdessä maksan kanssa aina viiteen päivään asti kuolemasta. Tutkimuksen eettisyyden kannalta oli hyvä, että perikardiumaspiraattit kerättiin kuolleilta. Näin ei ollut riskiä aiheuttaa vahinkoa terveille eikä näytteenotosta ollut muutenkaan haittoja tutkittaville.

Tulosten perusteella näyttäisi, että sepelvaltimotaudin vaikeusaste on suoraan verrannollinen perikardiumnesteen suuperäisen bakteeri DNA:n määrään 1-5 päivää kuolleiden osalta. Aikaisempaa tutkimusta aiheesta ei ole julkaistu. Tutkittavien määrä oli kuitenkin niin pieni, että aihe vaatii lisätutkimusta suuremmalla otoskoolla, jotta sepelvaltimotaudin vaikeusasteen ja suuperäisten bakteereiden välillä voitaisiin luotettavasti osoittaa kausaalisuus. Perikardiumnesteen roolia sydän-

ja verisuonitaudeissa olisi tulosten perusteella syytä selvittää lisää ja mahdollisuuksien mukaan pyrkiä hyödyntämään perikardiumnestettä enemmän tulevaisuudessa tautien diagnosoinnissa ja esimerkiksi oikeuslääketieteellisissä ruumiinavauksissa. Sepelvaltimotaudin ennaltaehkäisyssä elämäntapamuutokset ovat merkittävässä asemassa, joten suun hygieniaan ja hammasterveyteen voisi olla aihetta kohdentaa enemmän huomiota muiden riskitekijöiden ohella.

## LÄHTEET

- 1 Encyclopædia Britannica Online, s. v. "pericardial fluid," accessed May 31, 2012, <http://www.britannica.com/EBchecked/topic/451651/pericardial-fluid>.
- 2 Ben-Horin, S., Shinfeld, A., Kachel, E., Chetrit, A., Livneh, A. The composition of normal pericardial fluid and its implications for diagnosing pericardial effusions, *American Journal of Medicine* 2005; 118: 636–40. [PMID 15922695](#)
- 3 Dudzinski, D.A., Mak, G.A., Hung, J.W. Pericardial Diseases, *Current Problems in Cardiology*, 2012, vol. 37 no. 3 75-118.
- 4 Putz, R., Pabst, R. (2009). *Sobotta Atlas of Human Anatomy. One Volume Edition Latin Nomenclature 14<sup>th</sup> Edition*. Elsevier. s. 332
- 5 Jacob, R., Grimm, R.A. (2009), [Pericardial Disease](http://www.clevelandclinicmeded.com), <http://www.clevelandclinicmeded.com>
- 6 Ben-Horin, S., Bank, I., Shinfeld, A., Kachel, E., Guetta, V., Livneh, A. Diagnostic value of the biochemical composition of pericardial effusions in patients undergoing pericardiocentesis, *The American Journal of Cardiology*, 2007; 99(9): 1294-1297.
- 7 [Cardiovascular diseases \(CVDs\)](#), WHO, 2011, <http://www.who.int>
- 8 McGill Jr., H.C., McMahan, C.A., Gidding, S.S. Preventing Heart Disease in the 21<sup>st</sup> Century: Implications of the Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth (PDAY) Study, *Circulation*, 2008; 117: 1216-1227.
- 9 Yusuf, S., Hawken, S., Ôunpuu, S., Dans, T., Avezum, A., Lanas, F., McQueen, M., Budaj, A., Pais, P., Varigos, J., Lisheng, L. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study, *The Lancet*, 2004; vol. 364 no. 9438: 937-952.
- 10 Li, X., Kolltveit, K.M., Tronstad, L., Olsen, I. Systemic Diseases Caused by Oral Infection, *Clin. Microbiol. Rev.* October 2000 vol. 13 no. 4 547-558.
- 11 Haraszthy, VI., Zambon, JJ., Trevisan, M., Zeid, M., Genco, RJ. Identification of periodontal pathogens in atheromatous plaques, *J. Periodontal*, 2000; 71: 1554-1560.
- 12 Lehtiniemi, J., Karhunen, P. J., Goebeler, S., Nikkari, S. and Nikkari, S. T., Identification of different bacterial DNAs in human coronary arteries, *European Journal of Clinical Investigation*, 2005; 35: 13–16.
- 13 Yoshida, A., Suzuki, N., Nakano, Y., Oho, T., Kawada, M., Koga, T. Development of a 5´ Fluorogenic Nuclease-Based Real-Time PCR Assay for Quantitative Detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*, *J. Clin. Microbiol.* February 2003 vol. 41 no. 2 863–866.
- 14 Yoshida, A., Suzuki, N., Nakano, Y., Oho, T., Kawada, M., Koga, T. Development of a 5´ Nuclease-Based Real-Time PCR Assay for Quantitative Detection of Cariogenic Dental Pathogens *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*, *J. Clin. Microbiol.* September 2003 vol. 41 no. 9 4438–4441.
- 15 Lamas, C.C., Eykyn, S.J. "Blood culture negative endocarditis: Analysis of 63 cases presenting over 25 years", *Heart (British Cardiac Society)*, 2003; 89 (3): 258–262.



- 16 Stelzel, M., Conrads, G., Pankuweit, S., Maisch, B., Vogt, S., Moosdorf, R., Flores-de-Jacoby, L. Detection of Porphyromonas gingivalis DNA in aortic tissue by PCR, *J. Periodontal*, 2002; 73: 868-870.
- 17 Nagata, E., de Toledo, A., Oho, T. Invasion of human aortic endothelial cells by oral viridans group streptococci and induction of inflammatory cytokine production, *Mol Oral Microbiol*, 2011; 26: 78-88.
- 18 Ohki, T., Itabashi, Y., Kohno, T., Yoshizawa, A., Nishikubo, S., Watanabe, S., Yamane, G., Ishihara, K. Detection of periodontal bacteria in thrombi of patients with acute myocardial infarction by polymerase chain reaction, *Am Heart J.*, 2012; 163: 164-167.
- 19 Kozarov, E., Sweier, D., Shelburne, C., Progulsk-Fox, A., Lopatin, D. Detection of bacterial DNA in atheromatous plaques by quantitative PCR, *Microbes and Infection*, 2006; 8(3): 687-693.
- 20 Tuomisto, S., Karhunen, P.J., Vuento, R., Aittoniemi, J., Pessi, T. Evaluation of post mortem bacterial migration using culturing and real-time quantitative PCR, *Journal of Forensic Sciences* (in press)
- 21 Bierly, A. The expanding role of PCR in research and medicine, *Medical Laboratory Observer*, 2012; 44(5): 24, 26
- 22 Suzuki N, Yoshida A, Nakano Y. Quantitative analysis of multi-species oral biofilms by TaqMan real-time PCR, *Clinical Medicine & Research*, 2005; 3:176-85.
- 23 Mattila, K.J., Nieminen, M.S., Valtonen, V.V., Rasi, V.P., Kesäniemi, Y.A., Syrjälä, S.L., Jungell, P.S., Isoluoma, M., Hietaniemi, K., Jokinen, M.J. Association between dental health and acute myocardial infarction, *BMJ*, 1989; 298(6676): 779-781.
- 24 Gaetti-Jardim Jr., E., Marcelino, S.L., Feitosa, A.C.R., Romito, G.A., Avila-Campos, M.J. Quantitative detection of periodontopathic bacteria in atherosclerotic plaques from coronary arteries, *Journal of Medical Microbiology*, 2009; 58(12): 1568-1575.
- 25 Herzberg, M.C., Nobbs, A., Tao, L., Kilic, A., Beckman, E., Khammanivong, A., Zhang, Y. Oral streptococci and cardiovascular disease: searching for the platelet aggregation-associated protein gene and mechanisms of Streptococcus sanguis-induced thrombosis, *Journal of periodontology*, 2005; 76(11): 2101-2105.
- 26 Honkala, S. Hampaan kiinnityskudokset, suun limakalvot ja kieli, *Terveyskirjasto*, [www.duodecim.fi](http://www.duodecim.fi), 2009
- 27 Seow, W.K., Lam, J.H., Tsang, A.K., Holcombe, T., Bird, P.S. Oral Streptococcus species in pre-term and full-term children - a longitudinal study. *Int J Paediatr Dent*. 2009; 19: 406-411.
- 28 Apfalter, P., Barousch, W., Nehr, M., Makristathis, A., Willinger, B., Rotter, M., Hirschl, A.M. Comparison of a new quantitative ompA-based real-Time PCR TaqMan assay for detection of Chlamydia pneumoniae DNA in respiratory specimens with four conventional PCR assays. *J Clin Microbiol*. 2003; 41: 592-600.
- 29 Kuboniwa, M., Amano, A., Kimura, K.R., Sekine, S., Kato, S., Yamamoto, Y., Okahashi, N., Iida, T., Shizukuishi, S. Quantitative detection of periodontal pathogens using real-time polymerase chain reaction with TaqMan probes. *Oral Microbiol Immunol*. 2004; 19: 168-176.
- 30 Nonnenmacher, C., Dalpke, A., Mutters, R., Heeg, K. Quantitative detection of periodontopathogens by real-time PCR. *J Microbiol Methods*. 2004; 59: 117-125.

## LIITTEET

Primerit ja probet	Sekvenssi (5'-3')	Lähde
<b>Streptokokkisuku pääosin <i>Str. mitis</i>- ryhmä</b>		20
Forward	CCAGCAGCCGCGTAATA	
Reverse	CCTGCGCTCGCTTTACG	
Probe	ACGCTCGGGACCTACG	
<b><i>Str. mitis/Str. oralis</i></b>		27
Forward	GCCATTGAAGCGGTTACTTTG	
Reverse	CATCCGACATTAACGCAAGTTC	
Probe	ATGATTGAGCGTGAACGGTGGGT	
<b>Streptokokkien virulenssitekijä gftG/gftP</b>		20
Forward	TTTACCATGGATGAGCTCAAGCAA	
Reverse	TTGGAGAGCATGAGAGCATG	
Probe	ACGCAGTTCAATATCC	
<b><i>Streptococcus anginosus</i> – ryhmä</b>		20
Forward	CCGTAGTGTGTTGTGCTAGGTGAAA	
Reverse	CCAGAGAGCTAGCTGTTTCGT	
Probe	CCGTAACGATTTCG	
<b><i>Staphylococcus aureus / S. epidermidis</i></b>		20
Forward	GCGTTTTTCACGTGGAATATC	
Reverse	AATCCAAAACAAAAACAAAGACAAGGT	
Probe	ACGTGCCATATTAATTAC	
<b><i>Chlamydomphila (née Chlamydia) pneumoniae</i></b>		28
Forward	ATCCGCTGCTGCAAACCTATACT	
Reverse	TGAACCACTCTGCATCGTGTA	
Probe	AGGCCGGTTAGGTCTATCTACGGCAGT	
<b><i>Treponema denticola</i></b>		29
Forward	CCGAATGTGCTCATTTACATAAAGGT	
Reverse	GATACCCATCGTTGCCTTGGT	
Probe	ATGGGCCCGCGTCCCATTAGC	
<b><i>Prevotella intermedia</i></b>		29
Forward	TCCACCGATGAATCTTTGGTC	
Reverse	ATCCAACCTTCCCTCCACTC	
Probe	CGTCAGATGCCATATGTGGACAACATCG	
<b><i>Fusobacterium nucleatum</i></b>		20
Forward	AGGGTGAACGGCCACAAG	
Reverse	TCTCGGTCCATTGTCCAATATTCC	
Probe	ACACGGCCCTTACTCC	
<b><i>Aggregatibacter (née Actinobacillus) actinomycetemcomitans</i></b>		30
Forward	CAAGTGTGATTAGGTAGTTGGTGG G	
Reverse	CCTTCCATCACCGAAAAGAA	
Probe	ATCGCTAGCTGGTCTGAGAGGATGGCC	
<b><i>Dialister pneumosintes</i></b>		30
Forward	GAGGGGTTTGC GACTGATTA	
Reverse	CCGTCAGAC TTT CGTCCATT	
Probe	CACCAAGCCGACGATCAGTAGCCG	
<b><i>Porphyromonas gingivalis</i></b>		30
Forward	TGCAACTTGCCTTACAGAGGG	
Reverse	ACTCGTATCGCCGTTATTC	
Probe	AGCTGTAAGATAGGCATGCGTCCCATTAGCTA	
<b><i>Parvimonas micra</i></b>		30
Forward	AAACGACGATTAATAACCACATGAGAC	
Reverse	ACTGCTGCCTCCCGTAGGA	
Probe	TCAAAGATTATCGGTGTAAGAAGGGCTCGC	
<b>Universaali</b>		30
Forward	TGGAGCATGTGGTTTAATTCGA	
Reverse	TGCGGGACTTAACCCAACA	
Probe	CACGAGCTGACGACA[A/G]CCATGCA	

Liite 1. Lajispesifiset primerit ja TaqMan probet reaaliaikaista kvantitatiivista PCR – ajoa varten